

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA A AQUICULTURA

**IMUNOESTIMULAÇÃO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM A CIANOBACTÉRIA
Spirulina platensis.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANE M. PERAZZOLO

PEDRO HENRIQUE AMBRÓSIO RODRIGUES

Florianópolis, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**IMUNOESTIMULAÇÃO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM A CIANOBACTÉRIA
Spirulina platensis.**

PEDRO HENRIQUE AMBRÓSIO RODRIGUES

Este Trabalho de Graduação foi julgado adequado para a obtenção do título de Biólogo e aprovado em sua forma final pela Comissão examinadora e pelo Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo
(Orientadora)

Msc. Priscila Gonçalves

Prof. Dr. Wladimir Lobo Farias

**Ao meu avô, Vanderlei Ambrósio, que será, para sempre, a minha
inspiração para ser um homem cada vez melhor.**

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Luciane Perazzolo, pelo ensinamento, pela abertura de portas e pela intensa dedicação com meu trabalho, ao laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura e todos os seus membros que se tornaram amigos e companheiros de trabalho. A professora Margherita por estar sempre disposta a ajudar com o que fosse preciso. Agradeço ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC e a fazenda Aquísia (CE), pelo fornecimento dos animais utilizados no presente trabalho, ao laboratório de Bioquímica Marinha da UFC pelo fornecimento da Biomassa Seca e dos Polissacarídeos Sulfatados de *S. platensis* e em especial, ao professor Wladimir, que esteve o tempo todo integrado ao trabalho provendo todo o auxílio necessário. Não poderia esquecer da Aninha, que foi peça fundamental para a realização deste e de todos os demais estágios. Agradeço também a CAPES pelo auxílio financeiro nos experimentos e nas viagens de estudo.

Agradeço a minha família pela confiança e apoio em todas as minhas escolhas, por mais difíceis ou tortas que pudessem ser. Minha irmã, Marianna, por ser a maior e mais importante certeza que tenho (e a minha melhor amiga). Minha mãe, Sandra, por ser simplesmente tudo que uma mãe deve ser e me lembrar que sempre existe o caminho de casa, o colo e o abraço. Meu pai, por acreditar em mim e torcer pelo sucesso, sempre. Minha madrinha, tia e amiga, Dedé, que é, provavelmente, a pessoa que mais confia em mim e ser minimamente digno de suas expectativas é um impulso contínuo para mim. Meu padrinho, Dudu, pela sabedoria e exemplo de dedicação com os estudos. Agradeço a Milena, minha prima gênio que, além de toda sabedoria, ainda consegue ser alguém com quem eu posso falar sobre tudo. Ao Dolce, por ser meu gato-filho-melhor amigo.

Agradeço aos meus amigos. Seria impossível citar todos, mas injusto não citar nenhum. Rodrigo, por ter tudo a ver comigo, me entender e me aguentar mesmo quando eu não me aguentava. Fifi, Gabizaum e Carinaum, por mostrarem que não importa o tempo que passe, sempre vamos torcer uns pelos outros. Ao César, por ser completamente diferente de mim, mas me entender como poucos. Ao Diego por ser sempre quem mais vê o lado bom das coisas. Ao Leonardo pelas risadas, companheirismo e por cuidar do meu filho. Guilherme, por representar a amizade sem limites. Agradeço a Giane, por ter a risada mais gostosa de ser ouvida no universo. Nega do Bafão, por ser um exemplo de ser-humano bom e íntegro, além de ter me unido ao grande amor da minha vida, Caio, com quem quero continuar tendo o cotidiano que eu sempre sonhei. Escrevendo esses agradecimentos vejo como preciso agradecer a Deus, por colocar na minha vida jóias de valor inestimável na forma de pessoas lindas com quem quero continuar dividindo a minha vida. Gui, Piim, Samara, Laira, William, Marcelinha, Lara, Thi, Celo, Bruno... Amigos eternos, verdadeiros, amados.

Obrigado!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
Sistema imune dos crustáceos.....	4
Ação imunoestimulante de polissacarídeos sulfatados (OS) e lipopolissacarídeos (LPS).....	9
Cianobactéria <i>Spirulina platensis</i>	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Animais	13
3.2. Preparo da ração suplementada.....	14
3.3. Imunoestimulação de <i>L. vannamei</i> pela Biomassa Seca (0,3%).....	15
3.4. Imunoestimulação de <i>L. vannamei</i> pelos Polissacarídeos Sulfatados (0,5%).....	16
3.5. Coleta de Hemolinfa	17
3.6. Hemograma: Contagem total e diferencial de hemócitos	18
3.7. Atividade da Fenoloxidase (PO).....	18
3.8. Avaliação da Capacidade Aglutinante da Hemolinfa	19
3.9. Produção de Espécies reativas de Oxigênio: Ânions superóxido.....	19
3.10. Concentração de proteínas totais.....	20
3.11. Cálculo do consumo alimentar.....	20
3.12. Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS	20
4.1. Contagem Total de Hemócitos (CTH)	20
4.2. Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)	20
4.3. Atividade da Fenoloxidase	21
4.4. Capacidade Aglutinante da Hemolinfa	23
4.5. Concentração de proteínas totais.....	24
4.6. Produção de Ânions superóxido.....	26
4.7. Consumo Alimentar	27
5. DISCUSSÃO	28
6. REFERÊNCIAS	37

Resumo

A busca por novas substâncias capazes de aumentar a imunocompetência de camarões cultivados é de extrema importância para o sucesso desta atividade de grande impacto econômico. Neste contexto, o presente estudo avaliou, em separado, o efeito da biomassa seca (BS) e dos polissacarídeos sulfatados (PS) da cianobactéria *Spirulina platensis*, por meio da suplementação alimentar de adultos *Litopenaeus vannamei*. As condições de imunocompetência dos camarões foram avaliadas após 14 dias de tratamento com ração acrescida de 0,3% BS ou 0,5% PS (alimentação a 2% da biomassa) pela coleta de hemolinfa nos dias 0, 7 e 14. Foram analisados os seguintes imunoparâmetros: atividade da fenoloxidase (PO), hemograma, produção intracelular de ânions superóxido, capacidade aglutinante e concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP). Dentre estes, o hemograma e a atividade da PO aumentaram com a suplementação de ambos compostos (BS e PS) de espirulina, sendo que o número de células imunocompetentes (hemócitos totais) aumentou 33% e 28%, e a atividade da PO, 43% e 53%, respectivamente. Ambos os compostos promoveram ainda um aumento de 10% nos HG (hemócitos granulares), os maiores depositários das moléculas imunoefetoras dos crustáceos. Além disso, a suplementação alimentar elevou a CP (14%, PS) e a capacidade aglutinante da hemolinfa (20%, BS). Por outro lado, a produção intracelular de ânions superóxido não foi alterada após a suplementação com espirulina. Estes resultados em conjunto indicam que ambos compostos, quando administrados oralmente e na concentração testada, são capazes de melhorar as condições gerais de imunocompetência de *L. vannamei*, sugerindo que esta cianobactéria possa vir a ser utilizada como um suplemento na ração de camarões cultivados. Mais estudos, contudo, se fazem necessários para verificar um possível efeito imunomodulador da *S. platensis* sobre *L. vannamei*.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, sistema imune de crustáceos, imunoparâmetros, imunoestimulação, *Spirulina platensis*, polissacarídeo sulfatados

LISTA DE FIGURAS

1. **Figura 1.** Exemplar adulto de *Litopenaeus vannamei*.....3
2. **Figura 2.** Exemplar de *Spirulina platensis*.....11
3. **Figura 3.** Contagem total de hemócitos de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Biomassa Seca ou Polissacarídeos Sulfatados de *S. platensis*..... 21
4. **Figura 4.** Contagem diferencial de hemócitos de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Biomassa Seca ou Polissacarídeos Sulfatados de *S. platensis*..... 22
5. **Figura 5.** Atividade específica da Fenoloxidase em *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Biomassa Seca ou Polissacarídeos Sulfatados de *S. platensis*..... 23
6. **Figura 6.** Capacidade aglutinante do soro de *L. vannamei* contra eritrócitos de cão nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Biomassa Seca de *S. platensis*..... 24
7. **Figura 7.** Concentração de proteínas totais do soro de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Biomassa Seca de *S. platensis*..... 25

8. **Figura 8.** Concentração de proteínas totais da hemolinfa total de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar com Polissacarídeos Sulfatados de *S. platensis*..... **25**
9. **Figura 9.** Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* após indução *in vitro* com laminarina ou LPS..... **26**
10. **Figura 10.** Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* estimulados *in vitro* por um dos indutores: laminarina ou polissacarídeos sulfatados de *S. platensis*.....**27**

1. INTRODUÇÃO

Em razão da crescente estagnação da pesca e do aumento da procura por proteína animal, a aquicultura tem se tornado, nos últimos anos, uma grande alternativa para o suprimento da demanda por proteína de origem animal, apresentando elevado crescimento dentre os setores produtores de alimento. Dentro da maricultura, o cultivo de camarões marinhos, conhecido por carcinicultura, vem crescendo em diversos países, e é responsável pela maior parte do volume financeiro envolvido no comércio internacional de frutos do mar (FAO, 2010).

A carcinicultura é uma atividade fundamental na pauta de exportações de países em desenvolvimento, responsável pela geração de milhões de empregos. Atualmente, a China e a Tailândia são os principais produtores mundiais, sendo que, na América Latina, os principais produtores são México, Equador e Brasil. A espécie mais cultivada no mundo é *Litopenaeus vannamei*, representando (63,4% em 2008 do cultivo de peneídeos, e o restante dividido entre as espécies *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Marsupenaeus japonicus* e *Fenneropenaeus indicus* (FAO, 2010).

No Brasil, a atividade teve início na década de 1970 com a introdução do peneídeo *M. japonicus* no Nordeste. Entretanto, apesar de esta espécie ser a mais cultivada na Ásia naquela ocasião, ela não se adaptou bem às condições brasileiras, principalmente em função das baixas salinidades nas zonas de produção (BARBIERI e OSTRENSKY, 2002). Seguiram-se, então, tentativas para a domesticação das espécies nativas, como *Litopenaeus schmitti* (OSTRENSKY, 1997) e *Farfantepenaeus paulensis* (WASILIESKY, 2000), nas regiões Sul e Sudeste, e *Farfantepenaeus subtilis*, no Norte e Nordeste (TAVARES e SANTOS, 2006). No entanto, a baixa produtividade e lucratividade destas espécies levaram à desativação das fazendas.

Ainda na década de 1980, a espécie *Litopenaeus vannamei* (Figura 1) foi introduzida no país primeiramente na região Nordeste. Em Santa Catarina, a espécie passou a ser cultivada em 1998, com tecnologia desenvolvida pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Empresa de Pesquisa

Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI), a fim de viabilizar a carcinicultura no Estado.



Figura 1. Exemplar adulto de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

Fonte: <http://macariobatista.blogspot.com.br>

L. vannamei é conhecido como camarão branco do Pacífico e é naturalmente encontrado desde a província de Sonora no México, até o sul de Tumbes, no Peru (PÉREZ-FARFANTE e KELSE, 1997). Esta espécie possui excelentes características zootécnicas, como rusticidade no manejo, boa conversão alimentar, rápido crescimento, facilidades na reprodução em cativeiro, além de poder ser cultivada em águas oligohalinas, crescendo em ambientes com salinidade variando de 0,5 a 40 ppm (NUNES, 2001).

No Brasil, este peneídeo se adaptou às condições climáticas e ambientais encontradas no Nordeste, e nesta região podem ser obtidas até 2,5 safras por ano. Com relação à Santa Catarina, os dados do setor mostraram um crescimento vigoroso da produção, com um volume triplicado no período de 1999 e 2002, sendo que no último ano houve um incremento de 97% no setor. A produtividade cresceu de forma bastante acentuada, como resultado de um melhor desempenho dos recursos tecnológicos nos cultivos, e também do desenvolvimento da indústria de alimento animal no país, corroborando para o incremento do segmento de camarão cultivado (BUGLIONE NETO, 2009). Desta forma, a atividade passou por uma rápida evolução, com intensificação dos sistemas e das técnicas de produção, visando a um aumento da lucratividade e eficiência nos cultivos.

No entanto, a intensificação dos cultivos, na maioria das vezes, não leva em conta os aspectos ecológicos do ambiente e fisiológicos dos animais (BACHÈRE, 2000) propiciando, assim, o surgimento de enfermidades entre os animais e a degradação ambiental (BORGHETTI *et al.*, 2003). Sabe-se também que fatores ambientais potencialmente estressores, como alterações nos parâmetros físico-químicos da água, presença de metais pesados, pesticidas agrícolas e poluentes no ambiente podem alterar o sistema imune dos camarões, debilitando-os e propiciando o estabelecimento de doenças (CHANG, 2006). Além disso, a água dos cultivos abriga naturalmente inúmeros microrganismos potencialmente patogênicos e, uma vez instalada a doença, a transmissão entre os animais ocorre rapidamente (BOYD, 1979).

Os camarões podem ser suscetíveis a diferentes patógenos (protozoários, fungos, bactérias e vírus) que geram enfermidades, muitas delas endêmicas e/ou pandêmicas, que causam sérias perdas econômicas advindas da diminuição na produção. No momento, a profilaxia e o controle de doenças nos cultivos estão basicamente restritos às boas práticas de manejo e à redução nas condições de estresse, uma vez que os fatores que determinam o estado de saúde dos camarões são ainda pouco conhecidos.

Entre as principais enfermidades em peneídeos, destacam-se as infecções virais (*vide* revisões LIGHTNER 2005; 2011), responsáveis por perdas econômicas catastróficas na carcinicultura mundial, especialmente no cultivo de *L. vannamei* e *P. monodon*. Como exemplo, podem-se citar as perdas em SC, em 2005, causadas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV; do inglês, *white spot syndrome virus*) que dizimou cerca de 75% do cultivo catarinense de *L. vannamei* (SEIFFERT *et al* 2005). No Nordeste brasileiro, onde se concentram 95% da produção nacional de camarões marinhos, outro vírus, denominado vírus da mionecrose infecciosa (IMNV; do inglês, *infectious myonecrosis virus*) também causou sérios prejuízos ao setor desde 2002 (NUNES *et al.*, 2004), com perdas na produção até o momento de 40% (NUNES *et al.*, 2011). A confecção de vacinas, no termo clássico da palavra, é inviável para invertebrados como os crustáceos, já que o organismo destes animais não é apto a produzir anticorpos antígeno-específicos, e não possui, portanto, sistema imune adaptativo que lhe confira uma memória imunológica em longo prazo (*vide* revisão BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA,

no prelo). Desta forma, camarões não podem ser imunizados como os animais vertebrados, a exemplo dos peixes. Sendo assim, torna-se cada vez mais importante a busca por compostos que aumentem a imunocompetência desses animais, bem como o desenvolvimento de terapias eficazes para o controle das enfermidades, a fim de evitar o uso de compostos químicos tóxicos ou antibióticos (*vide* revisão HAUTON, BROWN, SMITH, 2003). No entanto, para isso, deve-se ter um conhecimento prévio e amplo sobre o sistema de defesa dos crustáceos.

Sistema imune dos crustáceos

Os crustáceos, assim como todos os invertebrados, possuem apenas um sistema imune inato ou natural, portanto, não possuem a imensa gama de anticorpos específicos e células de memória, que compõem o sistema imune adaptativo dos vertebrados. Por isso, é importante ressaltar, mais uma vez, que não é possível o desenvolvimento de vacinas que os proteja em longo prazo contra infecções reincidentes. No entanto, deve-se salientar que a teoria que defende que os invertebrados contam apenas com um sistema de defesa, desprovido de qualquer tipo de especificidade e memória imunológica, vem sendo recentemente contestada, frente às novas descobertas que apontam para a potencial presença de uma “imunidade adaptativa alternativa” descrita por vários autores (*vide* revisões de KURTZ, FRANZ, 2003; KURTZ, ARMITAGE, 2006; JOHNSON; VAN HULTEN; BARNES, 2008).

O sistema circulatório dos crustáceos é do tipo aberto ou semiaberto, por onde transita um tecido fluido denominado hemolinfa, que corresponde ao sangue dos vertebrados, e que é composto por uma fração celular (hemócitos) e uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. Os hemócitos e os fatores humorais atuam em sinergismo para proteger o organismo dos crustáceos contra invasões e infecções por patógenos, garantindo, assim, sua sobrevivência (*vide* revisão de BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, *no prelo*).

Os hemócitos são as células imunocompetentes dos crustáceos, responsáveis tanto pelas respostas celulares de defesa, como pela síntese da maioria das moléculas imunológicas. Essas células respondem à invasão de microrganismos e parasitas, destruindo-os por fagocitose ou isolando-os em agregados hemocíticos, através da formação de nódulos e cápsulas (*vide* revisão de JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Os mecanismos de lise e morte dos patógenos são ainda auxiliados pela atuação de moléculas microbidas e/ou citotóxicas, exocitadas pelos hemócitos no sítio de infecção, ou resultantes da clivagem proteolítica de proteínas de sistemas de defesa adjacentes (CERENIUS *et al.*, 2010).

Segundo suas características morfofisiológicas, os hemócitos dos crustáceos são classificados em: hialinos (HH), hemócitos com grânulos pequenos (HGP) e com grânulos grandes (HGG) (SÖDERHÄLL e SMITH, 1983), sendo que a proporção na hemolinfa de cada tipo celular em animais saudáveis pode variar drasticamente conforme a espécie (GARGIONI e BARRACCO, 1998; HOLMBLAD e SÖDERHÄLL, 1999).

A hemolinfa dos crustáceos contém moléculas capazes de discriminar eficientemente o próprio do não-próprio e, assim, desencadear mecanismos que resultem na neutralização e/ou na destruição dos micro-organismos e parasitas invasores. Essas reações são geralmente iniciadas pelo reconhecimento do agente invasor por proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs; do inglês, *pattern-recognition proteins*) produzidas pelo hospedeiro. Após reconhecimento, as PRPs interagem com padrões moleculares expressos exclusivamente na superfície dos micro-organismos e ausentes no hospedeiro, conhecidas por PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) (*vide* revisão de BARRACCO, PERAZZOLO e ROSA, *no prelo*).

As PRPs são secretadas para o plasma ou estão aderidas à membrana ou, ainda, livres no citosol das células imunocompetentes. Quando associadas às membranas, essas proteínas são usualmente denominadas de PRRs (do inglês, *pattern-recognition receptors*) (Lee; Söderhäll, 2002). Em invertebrados, os principais PAMPs reconhecidos por PRPs são: *lipopolissacarídeos* (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas e de cianobactérias, *peptidoglicanas* (PGN) de bactérias Gram-positivas, β -1,3-*glicanas* de fungos, o *RNA de dupla fita* ou dsRNA (do inglês, *double-stranded RNA*) produzido

durante a replicação da maioria dos vírus, RNA de fita simples (ssRNA; do inglês, *single-strand RNA*) e motivos CpG (DNA não-metilado) de microrganismos (LOKER *et al.*, 2004).

Dentre as PRPs identificadas e caracterizadas até o momento nos crustáceos, destacam-se as *lectinas*, que reconhecem açúcares específicos da superfície de diferentes microrganismos, a *LBP* (do inglês, *lipopolysaccharide binding protein*) que interage com lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas, as β *GBP* (do inglês, β -1,3-*glucan bindingprotein*) e *GBP* (do inglês, *glucan binding protein*) que se ligam a β -1,3-glicanas da parede de fungos, a *LGBP* (do inglês, *lipopolysaccharide and β -1,3-glucan bindingprotein*) e a *mas-like* (*masquerade-like protein*) que reconhecem tanto LPS como β -1,3-glicanas (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Uma vez dentro do hospedeiro, as interações seguintes promovem a ativação dos hemócitos, que migram para os sítios de infecção e desencadeiam diferentes mecanismos envolvidos nas respostas imunes, tais como: (1) sistema fagocítico e de encapsulamento; (2) ativação dos componentes do sistema pró-fenoxidase (propor); (3) produção de compostos líticos e microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROIs e RNIs; do inglês, *reactive oxygen intermediates* e *reactive nitrogen intermediates*, respectivamente); (4) produção de moléculas imunoefetoras, como as proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (AMPs) que apresentam geralmente uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de micro-organismos; (5) sistema de coagulação da hemolinfa; (6) sistema de reconhecimento mediado por proteínas de reconhecimento de padrão; (7) sistemas antivirais mediados por RNA de interferência, citocinas análogas a *interferon* e apoptose; e (8) modulação da expressão de genes imunológicos específicos (*vide* revisão BARRACCO, PERAZZOLO e ROSA *no prelo*).

No caso da formação de nódulos e cápsulas hemocíticas em crustáceos, observa-se frequentemente uma reação central de melanização, também observada durante a cicatrização de ferimentos (SODERHALL e CERENIUS, 1998), que é decorrente da ativação do sistema proPO. O sistema de ativação da proPO consiste em uma cascata proteolítica composta por vários zimógenos de proteases, pela proPO, além das PRPs e moléculas associadas

(CERENIUS *et al.*, 2008) e cujo produto final é o pigmento melanina. Este sistema é considerado um dos mais importantes em crustáceos no que tange o reconhecimento do *não-próprio*, e é ativado tanto por LPS e PGN de bactérias, como por β -1,3-glicanas de fungos (CERENIUS *et al.*, 2008; 2010). Contudo, o papel imunológico do sistema proPO reside no fato de que essa via gera transitoriamente moléculas citotóxicas como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres, que efetivamente auxiliam na destruição dos patógenos invasores (VAVRICKA *et al.*, 2010).

Por outro lado, uma ativação generalizada deste sistema resultaria em um grande prejuízo fisiológico para o próprio hospedeiro, que é igualmente suscetível à ação citotóxica dessas moléculas. Para tal, o hospedeiro possui inibidores de proteases dissolvidos em seu plasma, que regulam o sistema, restringindo sua ativação no local da infecção. Dentre esses inibidores de proteases está a α 2-macroglobulina (α 2M), que é uma glicoproteína plasmática constitutivamente sintetizada pelos hemócitos (CHEN, 2007; CHENG, 2009), que atua como um inibidor de proteases de amplo espectro (serino, aspartato, cisteína e metalo-proteases), inibindo tanto proteases endógenas (do próprio hospedeiro), como aquelas exógenas, produzidas pelo patógeno durante o processo infeccioso (*vide* revisão de ARMSTRONG, 2006).

Dentre as PRPs dos crustáceos destacam-se as lectinas ou aglutininas, que são glicoproteínas que reconhecem e se ligam especificamente a açúcares da superfície de diferentes células, incluindo, microrganismos (*vide* revisão de MARQUES e BARRACCO, 2000). Essas moléculas possuem, pelo menos, dois sítios de ligação (bivalentes), o que as torna capazes de aglutinarem células que expressam seus açúcares ligantes. Além disso, algumas lectinas possuem o importante papel de aumentar a fagocitose de microrganismos, funcionando, assim, analogamente às opsoninas.

Outro processo importante que ocorre, porém, quando a quantidade de microrganismos invasores é maior ou quando os patógenos são de tamanho grande, como hifas de fungos, nematódeos e determinados protozoários, é a formação de nódulos e cápsulas, em cujos tecidos estes patógenos ficam aprisionados e são posteriormente destruídos. A formação de nódulos e cápsulas não só limita as respostas imunológicas à região agredida como também protege os tecidos do hospedeiro dos danos causados pelas

moléculas tóxicas e degradativas produzidas durante o processo inflamatório (VIDE REVISÃO DE BARRACCO, PERAZZOLO e ROSA, *no prelo*).

No momento em que ocorre a produção e a liberação de moléculas citotóxicas e/ou líticas pelos hemócitos, um importante aumento do consumo intracelular de oxigênio pela enzima NADPH oxidase é observado, em um fenômeno conhecido por *burst* respiratório. Uma série de compostos intermediários de oxigênio, altamente reativos, conhecidos como são então produzidos (BOGDAN *et al.*, 2000).

A NADPH oxidase está localizada na membrana celular e na superfície dos grânulos lisossomais e é ativada por componentes microbianos como os lipopolissacarídeos (LPS), as lipoproteínas da parede bacteriana e pelas β -glicanas da parede de fungos (BOGDAN *et al.*, 2000). A ativação da NADPH resulta na redução do oxigênio molecular a ânion superóxido (O_2^-) que pode se dismutar espontaneamente ou através da enzima intracelular superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é decomposto pela catalaseperoxissomal. O O_2^- pode ainda ser convertido a outros componentes citotóxicos, tais como o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) e ânions hidroxila (OH^-), pela reação de Haber-Weiss ou, após dismutação em H_2O_2 , ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlet (1O_2) e em cloraminas pela ação da mieloperoxidase (MOP) (BOGDAN *et al.*, 2000).

Os ROIs são oxidoradicais que possuem elétrons livres e não pareados em sua camada orbital mais externa, o que lhes confere uma elevada reatividade com estruturas e compostos próximos, tais como membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (DNA), funcionando, assim, como agentes microbicidas potentes, destruindo ou inibindo o crescimento dos microrganismos invasores (*vide* revisões de ANDERSON, 1996; BOGDAN *et al.*, 2000).

A avaliação e/ou quantificação da atividade de várias das moléculas acima descritas, bem como a quantificação dos hemócitos circulantes, podem ser utilizadas como parâmetros hemato-imunológicos para monitorar a saúde e o *status* imunológico dos camarões. Alternativamente, estes parâmetros imunológicos podem também ser utilizados para avaliar a capacidade que certas substâncias têm de aumentar a imunocompetência e/ou de imunoestimular

Ação imunoestimulante de polissacarídeos sulfatados (PS) e lipopolissacarídeos (LPS)

Substâncias ditas “imunoestimulantes” podem ser obtidas a partir de várias origens naturais e também por síntese química, com base na estrutura molecular dos próprios produtos naturais. Dentre estes compostos, destacam-se os componentes da parede celular de diferentes bactérias, fungos, micro e macroalgas. Neste sentido, muitas substâncias vêm sendo estudadas e testadas para averiguar seu potencial efeito imunoestimulante sobre os animais. Alguns dos principais compostos ativos descritos na literatura como sendo capazes de gerar uma imunoestimulação em camarões são carboidratos como: polissacarídeos sulfatados (PS), β -glicanas, lipopolissacarídeos (LPS), e peptidoglicanas (PGN) (*vide* revisão de SMITH, BROWN, HAUTON, 2003).

Estas substâncias, se eficazes, poderiam minimizar o efeito das enfermidades, seja aumentando a resistência natural dos camarões, seja diminuindo ou eliminando o uso de agentes químicos terapêuticos, como os antibióticos tradicionais, além de apresentarem uma série de vantagens sobre estes, tais como ausência de toxicidade ou residualidade, não promovem resistência, têm baixo custo e não ocasionam impactos negativos ao meio ambiente (BERGER, 2000).

Os PS são compostos largamente distribuídos entre os seres vivos, ocorrendo no tecido conjuntivo dos vertebrados (MATHEWS, 1975) e em menor quantidade nos invertebrados (CÁSSARO e DIETRICH, 1977). Além disso, são encontrados em grande quantidade nas algas marinhas (PAINTER, 1983; AQUINO *et al.*, 2005). Quimicamente, os PS são macromoléculas carregadas negativamente, atóxicas, que possuem propriedades gelatinizantes e espessantes (RODRIGUES, 2006), encontrados especialmente na parede celular de macro e microalgas, onde está presente tanto nos componentes fibrilares, quanto nos amorfos (Painter, 1983).

Os LPS são componentes da parede-celular de bactérias Gram-negativas e das cianobactérias sendo, no caso de bactérias, descritos e reconhecidos como um componente endotóxico e antigênico. A estrutura da molécula de LPS consiste em três diferentes partes: uma lipídica (lipídeo A) composta por um glicolipídeo responsável pela atividade endotóxica, ligado

covalentemente a uma cadeia de heteropolissacarídeo, que é subdividido em duas partes: o polissacarídeo central, que é constante dentro de espécies relacionadas, e a cadeia O-específica, que é altamente variável (KELETI *et al.* 1982).

Cianobactéria Spirulina platensis

Spirulina platensis (Figura 2) é uma cianobactéria filamentosa da família Cyanophyceae, Ordem Nostocales que cresce em água doce e salgada e cuja biomassa é constituída por mais de 60% de proteínas. É utilizada, portanto, como um complemento alimentar proteico para humanos (VONSHAK *et al.*, 1997). Essa cianobactéria se desenvolve amplamente também em lagos ricos em carbonato, localizados em zonas tropicais (JASSBY *et al.*, 1988). De forma interessante, *S. platensis* possui tanto LPS em sua parede celular, quanto PS em seu citoplasma (WEISE *et al.*, 1970).



Figura 2: Exemplar da cianobactéria *Spirulina platensis*;

Fonte: <http://www.kingherbs.com.cn/english.asp?id=193>

Há mais de vinte anos, *S. platensis* vem sendo utilizada em larga escala como um complemento nutricional para vários animais, inclusive seres humanos (especialmente na Ásia), ressaltando que não há na literatura relatos de que sua ingestão gere efeitos colaterais (*vide* revisão KAY, 1991). A utilização da espirulina como complemento alimentar está legalmente autorizada na Europa, no Japão e nos Estados Unidos pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), uma vez que não causa efeitos tóxicos ao organismo (BELAY *et al.*, 1993). No Brasil, a Anvisa (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*) permite sua comercialização desde que o produto final no qual o micro-organismo tenha sido adicionado tenha sido devidamente estudado e seus efeitos completamente sejam conhecidos.

Em mamíferos, HAYASHI e colaboradores (1996) relataram uma ação antiviral para *S. platensis* através da inibição seletiva da penetração do vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1), do citomegalovírus, do vírus do sarampo, da caxumba, da influenza A e do HIV-1 nas células. Esta atividade inibitória foi atribuída à alteração na conformação molecular dos PS da cianobactéria decorrente da quelação entre cálcio e dos grupos sulfato. Posteriormente, foi demonstrado que, quando administrado oralmente em humanos, o extrato de *S. platensis* ativou o sistema de imunidade inata, aumentando a atividade de células *Natural Killer* citotóxicas (HIRAHASHI *et al.*, 2002).

Além de inibir a replicação de certos vírus em mamíferos, os PS dessa cianobactéria também possuem atividade antioxidante (MIRANDA *et al.* 1998; BELAY, 2002) e podem inibir o desenvolvimento de cânceres, além de aumentar a produção de anticorpos no organismo (HAYASHI *et al.* 1996; BELAY, 2002).

Em animais aquáticos, a administração oral de *S. platensis* é utilizada para intensificar a coloração de peixes ornamentais (DUNCAN e KLESIOUS. 1996), bem como um imunoestimulante para aumentar a atividade fagocítica em bagres e carpas (WATANUKI *et al.*, 2006). No caso de peneídeos, existem poucos relatos sobre a utilização de *S. platensis* como imunoestimulante e, ao que parece, tanto a imersão dos camarões em extrato dessa cianobactéria quanto a injeção dele nos crustáceos pode aumentar a resistência dos animais a infecções causadas por bactérias *Vibrio* spp (LEE *et al.*, 2003; TAYAG *et al.*, 2010), ou pelo WSSV (RAHMAN *et al.*, 2006).

Além disso, a alimentação de camarões *Penaeus merguensis* com ração enriquecida com biomassa seca de *S. platensis* em uma concentração de 0,3%, aumentou a atividade fagocítica dos hemócitos de pós-larvas (LEE *et al.*, 2003), assim como o crescimento de pós-larvas de *L. vannamei* (NETO *et al.*, 2008).

Embora existam vários estudos ao redor do mundo sobre potenciais imunoestimulantes para crustáceos cultivados, informações sobre o efeito da cianobactéria *Spirulina platensis* sobre a imunidade de *L. vannamei* ainda são raros.

1. OBJETIVOS

1.1. *Objetivo geral*

Avaliar o efeito da administração oral da biomassa seca (BS) da cianobactéria *Spirulina platensis* e de seus polissacarídeos sulfatados (PS) sobre a imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei*, através da análise de diferentes parâmetros hemato-imunológicos.

1.2. *Objetivos específicos*

1. Determinar a melhor concentração de biomassa seca (0,25%, 0,5%, 1%) e polissacarídeos sulfatados (0,25%, 0,5%, 1%, 2%) da cianobactéria capaz de induzir aumento na imunocompetência dos camarões
2. Avaliar se existem diferenças entre o efeito da BS e do PS sobre a imunoestimulação dos animais
3. Determinar o hemograma dos animais através das contagens total e diferencial de hemócitos
4. Avaliar a imunocompetência dos animais tratados com os compostos de *S. platensis* através da análise da atividade específica da PO, da capacidade aglutinante da hemolinfa e da concentração de proteínas totais
5. Quantificar a produção intracelular *in vitro* de O_2^- pelos hemócitos incubados com: laminarina (β -1,3 glicanas), LPS (lipopolissacarídeos) ou PS .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Animais*

Neste estudo foram utilizados camarões adultos, machos e fêmeas, da espécie *Litopenaeus vannamei*, descendentes de animais SPF (do inglês: *specific pathogen free*) provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos

(LCM, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC) (n = 210, peso = ~12g) e da Fazenda Aquisia (utilizados nos experimentos iniciais realizados no laboratório de Bioquímica Marinha, BIOMAR, UFC), município de Paraipaba, Ceará (n = 84, peso ~10g). Os animais cedidos pelo LCM foram transferidos ao Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, BEG-CCB, UFSC), onde foram acondicionados em tanques de 40L, contendo água marinha filtrada (20-25°C) e mantidos sob aeração constante e renovação de 20% da água diariamente, após o sifonamento dos dejetos. Os animais foram estocados em uma densidade inicial de 18 animais/tanque. Os camarões foram aclimatados por sete dias antes do início dos experimentos e alimentados *ad libitum*, uma vez ao dia, com ração comercial para camarões adultos. Somente animais aparentemente saudáveis e na fase de intermuda foram selecionados para utilização nos experimentos.

2.2. Preparo da ração suplementada com *Spirulina platensis* e determinação da melhor concentração de Biomassa Seca (BS) da cianobactéria na ração

Inicialmente foi determinada a melhor concentração de biomassa seca da cianobactéria na ração capaz de aumentar a imunocompetência dos camarões. A biomassa seca foi fornecida pelo Laboratório de Bioquímica Marinha do Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA, DEP, CCA, UFC) e a cianobactéria foi cultivada em um tanque de 20 m³ na Estação de Piscicultura do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP/CCA/UFC), utilizando um sistema multitrófico de policultivo com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a fase de reversão sexual. Diariamente, a biomassa foi filtrada em uma malha de 60 micrometros e desidratada, por cerca de 24 horas, em estufa com recirculação de ar a 60°C e esta etapa experimental foi feita em colaboração com o referido laboratório. O preparo da ração suplementada com BS consistiu, inicialmente, na trituração de ração comercial (GUABI - 40% de proteína), e adição de uma das três diferentes concentrações de BS (0,25%, 0,5% e 1%) para 200 g de ração. A fim de se obter uma consistência adequada e uma durabilidade da ração de aproximadamente 40 minutos na água marinha,

adicionou-se gelatina comercial incolor a 10% dissolvida em água aquecida a 60°C. A mistura foi então repeletizada, seca *overnight* a 45°C, e deixada esfriar lentamente como descrito por Cantelli (2009). Paralelamente, uma ração controle, sem cianobactéria (0% BS), foi preparada seguindo os mesmos procedimentos.

Os camarões (n=84) foram acondicionados em tanques (40L) (n=7/tanque) no BIOMAR e separados em quatro grupos experimentais segundo a porcentagem de BS na ração: **G1**: 0%, **G2**: 0,25%, **G3**: 0,5% e **G4**: 1%. Todos os grupos foram feitos em triplicata. Cada grupo foi alimentado por sete dias, duas vezes ao dia (2% da biomassa total). Os animais foram amostrados por coleta de hemolinfa (*item 3.5*) nos dias 0 e 7 após o início da alimentação. O soro foi produzido imediatamente e este material foi congelado e transferido ao LIAA (UFSC) para realização das análises dos imunoparâmetros, conforme descrito nos itens 3.4 a 3.9. Este experimento inicial permitiu determinar duas concentrações de BS testadas que eram capazes de imunoestimular os camarões: 0,25% e 0,5%. Sendo assim, para o estudo definitivo selecionou-se, então, uma concentração intermediária, de 0,3% BS, para ser adicionada à ração, como detalhado a seguir.

2.3. Imunoestimulação de L. vannamei pela biomassa seca (0,3%) de S. platensis

Cerca de 108 camarões SPF foram divididos em dois grupos experimentais (n=54/grupo), segundo o fornecimento de ração acrescida, em que: **BS-** = animais alimentados com ração controle (0% BS) e **BS+** = animais alimentados com ração acrescida de 0,3% BS, conforme detalhado no item 3.2. Cada grupo experimental foi feito em triplicata (n = 18/tanque). Foram realizadas três coletas de hemolinfa (*item 3.5*) nos dias 0, 7 e 14, nas quais foram analisados os seguintes imunoparâmetros: hemograma (CHT e CDH), concentração total de proteínas, atividades da fenoloxidase e da α 2-macroglobulina, capacidade hemaglutinante da hemolinfa e produção intracelular de ânion superóxido (*itens 3.6 a 3.10*). Os animais coletados em

cada dia foram descartados do sistema, sendo amostrados apenas uma vez durante o experimento.

2.4. Imunoestimulação de L. vannamei pelos polissacarídeos sulfatados (PS) de S. platensis

Posteriormente ao experimento acima, avaliou-se o efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados desta cianobactéria, igualmente extraído e cedido pelo Biomar (UFC). A ração foi suplementada segundo os mesmos procedimentos detalhados anteriormente, contudo, a determinação da concentração de PS a ser acrescida na ração foi feita a partir da avaliação da produção de ânion superóxido *in vitro* em animais alimentados com ração não suplementada, utilizando-se, como indutor, além da laminarina, quatro diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 1% e 2%) do PS de *S. platensis*, segundo o método descrito no item 3.9.

A imunoestimulação foi encontrada a partir da concentração de 0,5% PS e esta foi utilizada no experimento definitivo. Para tal, 108 camarões foram divididos em 2 grupos experimentais (**PS-** e **PS+**), em triplicata (n=18/tanque), e alimentados duas vezes ao dia (biomassa de 2%) durante 15 dias, com ração acrescida (**PS+**) ou não (**PS-**) de 0,5% de PS. Foram realizadas três coletas (dias 0, 7 e 14) de hemolinfa (*item 3.5*). Neste caso, os animais coletados não foram descartados do sistema, ficando disponíveis para novas coletas com um intervalo mínimo de 6 dias entre elas, a fim de permitir que uma nova hematopoiese ocorresse. Os imunoparâmetros testados foram: hemograma (CTH e CDH), atividade da fenoloxidase e concentração de proteínas.

2.5. Coleta de hemolinfa

Para o experimento com BS, a coleta de hemolinfa foi realizada em três diferentes dias do experimento: dia zero (0), dia sete (7) e dia quatorze (14). Tal coleta foi constituída por três *pools* de três animais/tratamento. A hemolinfa foi coletada na região ventral abdominal, higienizada com etanol 70%, utilizando-se uma seringa de 1 ml (agulha de 13 x 0,45; 26 G1/2), previamente

resfriada (4°C) e sem anticoagulante. Imediatamente, uma pequena parte do volume retirado foi depositada em um microtubo contendo uma solução anticoagulante de Alsever Modificada (**AC1**: citrato de sódio 27 mM, NaCl 336 mM, glicose 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7,0) na proporção 1:2 (hemolinfa : AC1). Este material, chamado de *hemolinfa total*, foi utilizado para os hemogramas onde os hemócitos foram fixados em formaldeído a 4%. Para isso, 100 µl de hemolinfa total foram adicionados em 400 µl de MAS + formol (4%) (diluição final 15x).

Outra parte do material coletado (400 µl/pool) foi depositada em um tubo de 15 ml contendo outra solução anticoagulante (**AC2**, NaCl 450 mM, glicose 100 mM, citrato de sódio 30 mM, EDTA 10 mM, ácido cítrico 26 mM, pH 5,5) na proporção de 1:2 (hemolinfa : AC2) e utilizada para a quantificação da produção de ânions superóxido.

O restante da hemolinfa foi depositado em outro tubo (15 ml) e deixado coagular por 24 h a 4°C para obtenção do soro (repetidas centrifugações a 6.000 xg, 4°C) e posterior análise dos demais imunoparâmetros do experimento com BS (atividades da fenoloxidase, capacidade aglutinante da hemolinfa e concentração de proteínas totais).

No caso do experimento utilizando PS na ração, realizou-se apenas coleta de hemolinfa total (hemócitos + plasma) e não de soro. Para isso, a hemolinfa foi coletada como acima descrito, diretamente dentro do **AC1** e imediatamente utilizada para as análises de PO (atividade da fenoloxidase) e CP (concentração de proteínas totais). Uma pequena parcela (100 µl) foi acrescida de formaldeído a 4% em MAS (400 µl) e mantida a 4°C para análises posteriores (hemograma). No 14º dia do início do experimento foi avaliada a produção intracelular de ânions superóxido (EROs; *item 3.9*), a partir da coleta de hemolinfa em *pools* de três animais/tratamento/réplica, como descrito acima, na coleta com solução **AC2**.

2.6. Hemograma: contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos

Para a contagem total e diferencial de hemócitos, a hemolinfa fixada (100 µl) de cada amostra (hemolinfa + anticoagulante) foi misturada a uma

solução anticoagulante acrescida de 4% formaldeído (diluição final de 15x). O número das células foi então estimado em câmara de Neubauer, em triplicatas. A contagem diferencial de hemócitos foi realizada em microscopia de contraste de fase. A porcentagem relativa das populações de hemócitos circulantes foi estimada a partir da contagem de um mínimo de 100 células por *pool*.

2.7. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade enzimática da PO foi avaliada a partir de amostras de soro nos experimentos utilizando BS e de hemolinfa total, no caso dos experimentos com PS. Para tal, 50 µL de soro diluído 15X em TBS (NaCl 330mM, CaCl₂ 5mM, MgCl₂ 203,3 mM, TRIS 121,1 mM) ou 10 µl de hemolinfa total foram acrescidos em poços de uma microplaca (fundo chato) em presença de, , 50 µl ou 10 µl de tripsina (1 mg/ml em água ultrapura, Sigma) e 50 µl ou 250 µl do substrato enzimático L-DOPA (3 mg/ml em água ultrapura, Sigma) respectivamente. No caso da hemolinfa total, o grande volume de L-DOPA adicionado promove o rompimento dos hemócitos por choque hipotônico, favorecendo a liberação de seu conteúdo intracelular.

A formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo foi então quantificada em leitor de microplacas a 490 nm, após 10 min de incubação a 20°C. A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteína, em que uma unidade da atividade enzimática corresponde ao aumento de 0,001 na absorbância a 20°C (SÖDERHÄLL e HÄLL, 1984). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.8. Avaliação da capacidade aglutinante da hemolinfa

A titulação de aglutininas/lectinas na hemolinfa foi realizada com 50 µl de soro diluídos serialmente em TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5mM, pH 7,4) em poços de microplacas em fundo em “U”, e incubadas por 2 h a 25°C com 50 µl de uma suspensão de eritrócitos de cão a 2% em TBS, em câmara úmida. No controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco da maior

diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Esta análise foi feita apenas no experimento com BS e todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.9. Produção de espécies reativas de oxigênio: ânions superóxidos (O_2^-)

A produção de O_2^- , pelos hemócitos de *L. vannamei* foi quantificada pelo método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*, Sigma), segundo protocolo descrito por Guertler e colaboradores (2010).

A hemolinfa coletada em **AC2**, ela foi centrifugada a 800 xg, por 10 min a 4°C, os hemócitos ressuspensos em solução salina para peneídeos (SS-P: KCl 5,4 mM, $MgCl_2$ 2,6 mM, $CaCl_2$ 3 mM, NaCl 400 mM, $NaHCO_3$ 2 mM, pH 7,6) e ressubmetidos a nova centrifugação. Em seguida, uma suspensão de hemócitos (100 μ l) contendo $2,5 \times 10^6$ cél/ml foi preparada em SS-P e depositada, em quintuplicata, em poços de uma microplaca estéril (fundo chato), as células permaneceram em repouso por 10 min a 20°C para adesão. As monocamadas celulares foram, então, cuidadosamente lavadas (2x) com SS-P a 4°C e incubadas com 100 μ l dos indutores: LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (100 μ g/ml em SS-P - Sigma) ou laminarina digitata (β -1,3 glicanas; 2 mg/ml, Callochem) e o NBT 3% (substrato do ânion superóxido; Sigma).

Além destes indutores clássicos, avaliou-se a capacidade dos PS de *S. platensis* de induzir a produção de ânions superóxidos em hemócitos de animais não tratados com ração para permitir a determinação da melhor concentração de PS a ser adicionada a ração final (0,5%). As monocamadas controle receberam NBT e SS-P, sem a adição dos indutores. Em seguida, a placa foi incubada por 15 min a 20°C, no escuro. O sobrenadante foi removido, as células foram fixadas com metanol absoluto (10 min) e lavadas (3x) com metanol 70%. Após secagem ao ar, as células foram rompidas com KOH 2 M (120 μ l) e tratadas com DMSO (140 μ l) para a solubilização do precipitado azul de formazan. O conteúdo azul foi transferido para uma nova microplaca e mensurado espectrofotometricamente a 630 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.10. Concentração total de proteínas na hemolinfa

A concentração de proteínas totais das amostras (soro ou hemolinfa total) foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para o experimento com BS, utilizou-se soro diluído (3.000 x diluído) e no experimento com PS utilizou-se hemolinfa total (3.000 ou 6.000 x diluída) para as análises.

2.11. Consumo alimentar

Como citado anteriormente, foi ofertado aos animais a quantidade de ração equivalente a 2% do peso vivo/dia, em dois períodos (manhã/noite). Após 40 min da oferta de alimento, as sobras alimentares eram retiradas, secadas (40°C por 12h) e pesadas. O consumo alimentar foi calculado subtraindo-se a quantidade ofertada pela sobra alimentar.

2.12. Análises estatísticas

Para as análises foram utilizados os teste t *Student*, entre os diferentes tratamentos considerando cada dia de coleta, e ANOVA ($p < 0.05$), seguido pelo teste de comparação de médias de Tuckey, para diferenças entre os grupos controle nos diferentes dias de coleta.

3. RESULTADOS

3.1. Contagem Total de Hemócitos (CTH)

Os animais que não receberam suplementação alimentar mantiveram inalterado o número de hemócitos circulantes ao longo dos 14 dias do experimento, não apresentando, portanto, variação na CTH (Figura 6). Já a suplementação com espirulina, promoveu aumentos significativos na CTH dos camarões após ambos os tipos de suplementação, sendo que, no caso dos animais alimentados com BS (grupo BS+), registrou-se aumentos significativos de 27% e 33% após sete ($24,8 \pm 0,5 \times 10^6$ céls/ml) e 14 dias ($31,6 \pm 1 \times$

10^6 céls/ml) do início da alimentação, em relação aos controles respectivos ($19,5 \pm 0,5 \times 10^6$ céls/ml e $21,2 \pm 0,9 \times 10^6$ céls/ml) (Figura 6). Nos animais alimentados com ração acrescida de PS, aumentos significativos também foram encontrados após sete e 14 dias do início da suplementação, de, respectivamente, 18% ($35,4 \pm 1,6 \times 10^6$ céls/ml) e 28% ($39,3 \pm 3,5 \times 10^6$ céls/ml) em relação aos controles ($29,3 \pm 1,6 \times 10^6$ céls/ml e $28,3 \pm 0,4 \times 10^6$ céls/ml).

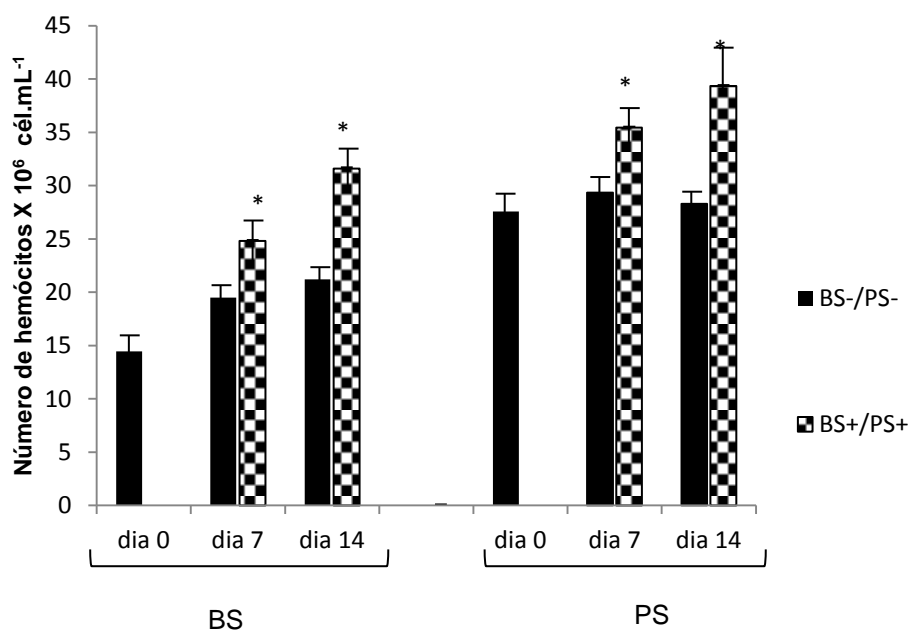


Figura 3. Contagem total de hemócitos (CTH) em *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar de *L. vannamei* com biomassa seca (BS) ou polissacarídeos sulfatados de *S. platensis* (PS). As barras representam a média \pm DP. Asterisco (*) representa diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as CTH dos grupos com ração suplementada (BS+ ou PS+) e não suplementada (BS- ou PS-).

3.2. Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)

Dentre os diferentes tipos de hemócitos circulantes, os hemócitos granulares (HG) se mostraram, como esperado, o tipo de célula predominante em todas as análises. Nos animais não tratados com nenhum composto de espirulina, a porcentagem dos tipos celulares não se alterou ao longo do experimento, sendo que os HG representaram, em média, 76% e os HH, 24% da população total de hemócitos. Já o tratamento com um dos compostos de espirulina, PS ou BS, aumentou o número dos HG nos dias, 7 e 14 ($p < 0,05$), em que este tipo celular representou em média 86% dos hemócitos

circulantes, enquanto os HH representaram 14%, contra os 76% e 25% registrados no dia zero, respectivamente.

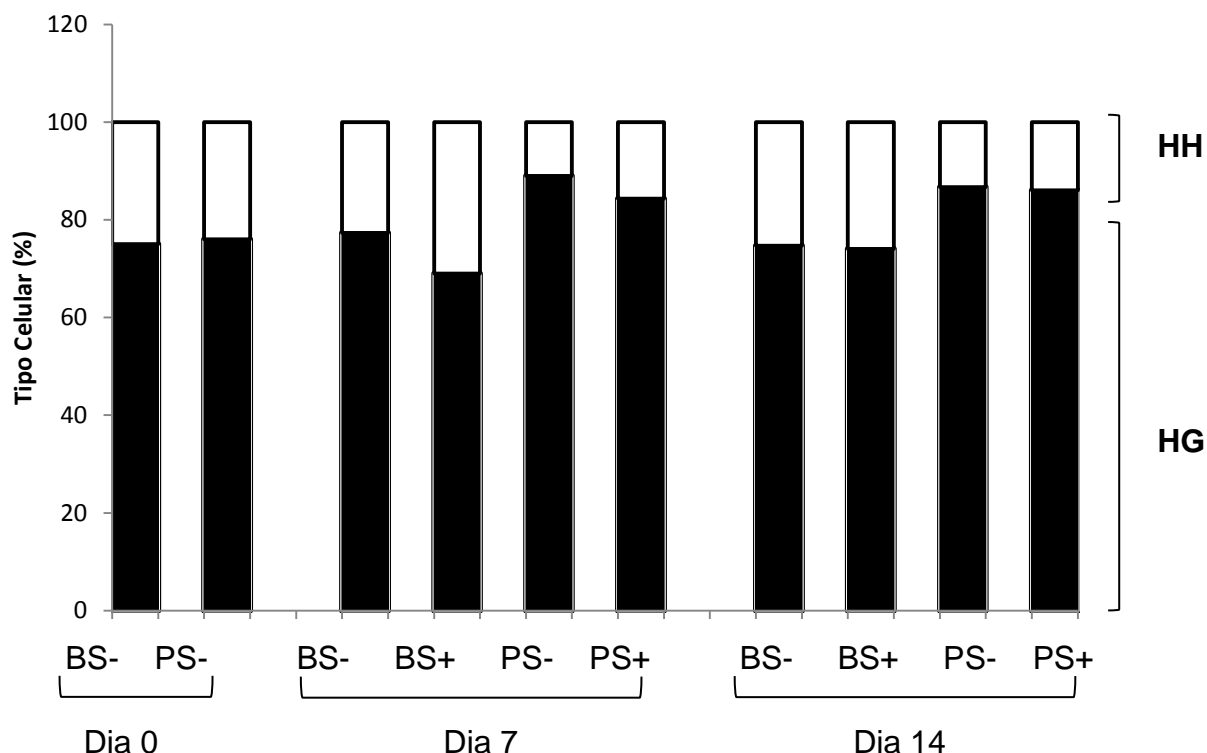


Figura 4. Contagem diferencial de hemócitos (CTH) em *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da suplementação alimentar de *L. vannamei* com biomassa seca (BS) ou polissacarídeos sulfatados de *S. platensis* (PS). As barras representam a média da CDH.

3.3. Atividade da fenoloxidase (PO)

No experimento com BS, a atividade da PO se manteve estatisticamente constante nos animais do grupo controle, cuja atividade específica foi em média de 40 U/min/mg de proteínas. Já nos animais tratados com BS, houve um aumento da atividade de 31% e 43% respectivamente, após sete e 14 dias de suplementação alimentar (Figura 8). Por outro lado, os PS da cianobactéria promoveram aumentos superiores na atividade específica da PO que aqueles do tratamento com BS, sendo de, respectivamente 45% e 53% após sete e 14 dias do início da alimentação. Comparando o aumento da PO entre os

tratamentos, observa-se que os dos controles permaneceram relativamente mais próximos.

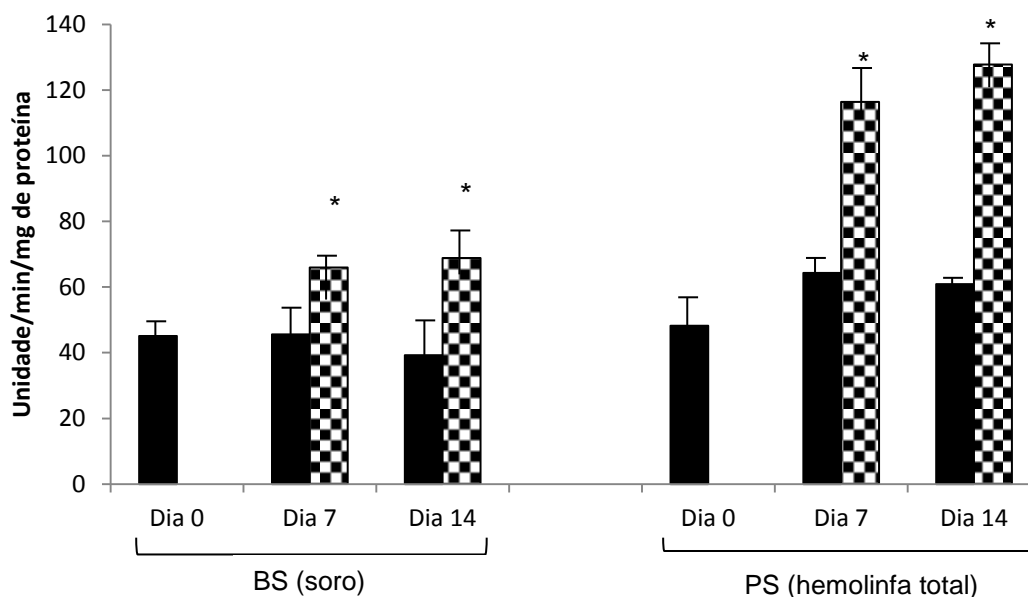


Figura 5. Atividade específica da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da alimentação com ração acrescida de 0,3% BS (biomassa seca) ou 0,5% PS (polissacarídeos sulfatados) de *S. platensis*. As barras representam a média \pm DP. O asterisco representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) da atividade da PO entre os animais alimentados com ração suplementada (BS+/PS+) ou não (0% BS-/PS-) com componentes de espirulina.

3.4. Capacidade aglutinante da hemolinfa

A capacidade hemaglutinante do soro dos animais foi testada apenas no experimento com BS e observou-se um aumento no título aglutinante de 20% nos animais suplementados ($15,2 \pm 0,5$) em relação aos animais controle ($12,2 \pm 0,5$), tanto no dia 7 quanto no dia 14 após o início da alimentação. Os títulos de aglutinação se mantiveram estáveis, dentro de cada grupo (suplementado ou não), ao longo do experimento, como pode ser observado na Figura 6.

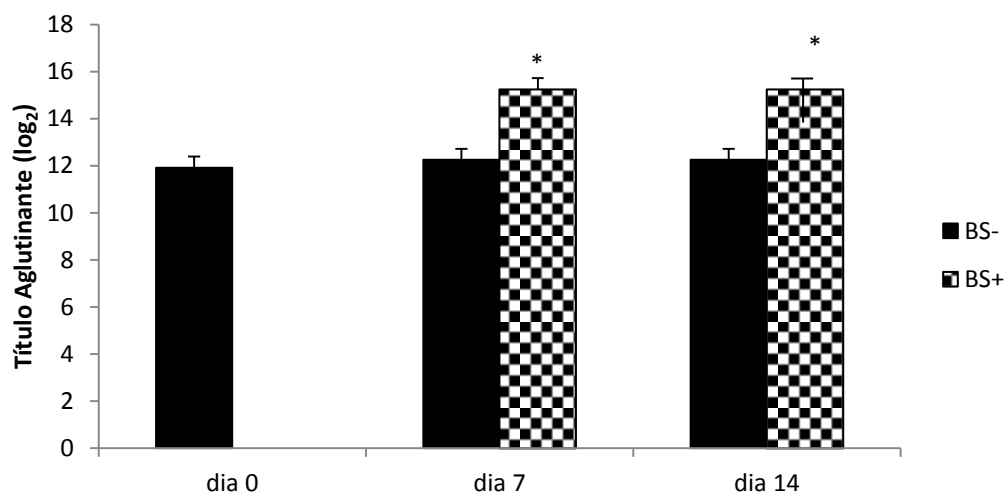


Figura 6. Capacidade aglutinante do soro de *L. vannamei* contra eritrócitos de cão, nos dias 0, 7 e 14 após o início da alimentação com ração adicionada de 0,3% BS. As barras representam a média \pm DP. O asterisco (*) representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) da capacidade hemaglutinante entre os animais alimentados com ração acrescida de 0,3% BS (BS+) ou não (0% BS-).

3.5. Concentração de proteínas totais (CP)

As análises de CP utilizando hemolinfa total (experimento com PS) apresentaram valores médios inferiores àqueles das análises com soro (experimento com BS). Contudo, a suplementação com BS diminuiu cerca de 10% a CP dos camarões após 14 dias de dieta suplementada (BS+: $136 \pm 4,4$ mg/ml; BS-: $150 \pm 4,5$ mg/ml) (Figura 10). No caso dos animais que receberam ração acrescida de PS, a CP aumentou 25% (118 ± 4 mg/ml) em relação ao grupo controle ($88 \pm 1,4$ mg/ml) no 14º dia do início da alimentação (Figura 11).

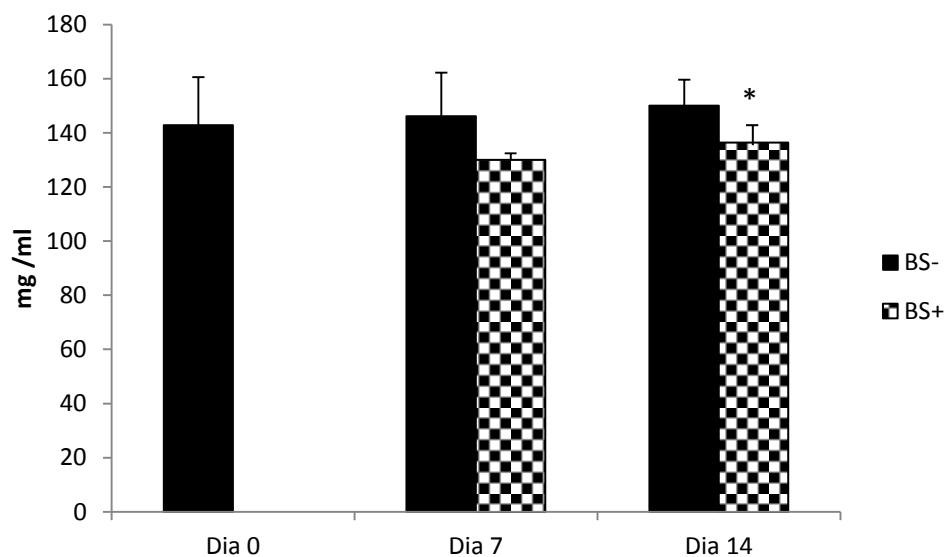


Figura 7. Concentração das proteínas totais do soro (CP) de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da alimentação com ração acrescida de 0,3% BS. As barras representam a média \pm DP. Asterisco (*) representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) da CP entre os animais alimentados com ração acrescida de 0,3% BS (BS+) ou não (0% BS-).

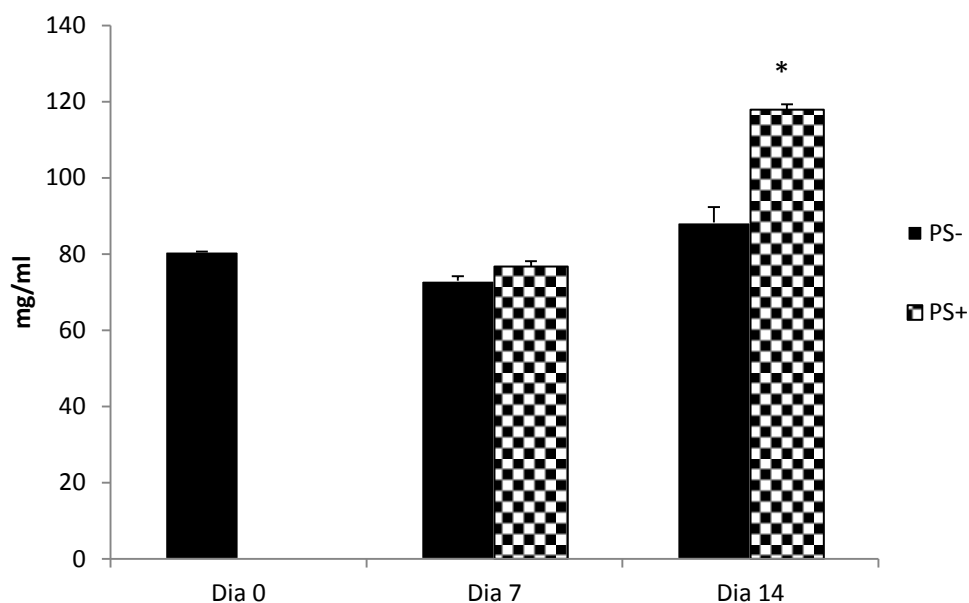


Figura 8. Concentração das proteínas totais da hemolinfa (CP) de *L. vannamei* nos dias 0, 7 e 14 após o início da alimentação com ração acrescida de 0,5% PS. As barras representam a média \pm DP.. Asterisco (*) representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) da CP entre os animais alimentados com ração acrescida de 0,5% PS (PS+) ou não (0% PS-).

3.6. Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido (O_2^-)

A suplementação alimentar com BS não foi capaz de imunoestimular a produção *in vitro* de O_2^- pelos hemócitos dos camarões após 14 dias de alimentação, com nenhum dos indutores celulares testados: laminarina e LPS (Figura 12). Convém lembrar que esta análise não foi realizada para os animais tratados com polissacarídeos sulfatados (PS).

No entanto, quando se utilizou os PS de *S. platensis* (0,5 a 2%) como indutores celulares da produção *in vitro* de ânions superóxido, observou-se uma estimulação de 45% a 58% em relação aos níveis basais de O_2^- produzidos (Figura 13). Convém ressaltar que, nesta análise, os hemócitos foram provenientes de camarões não tratados previamente com BS ou PS.

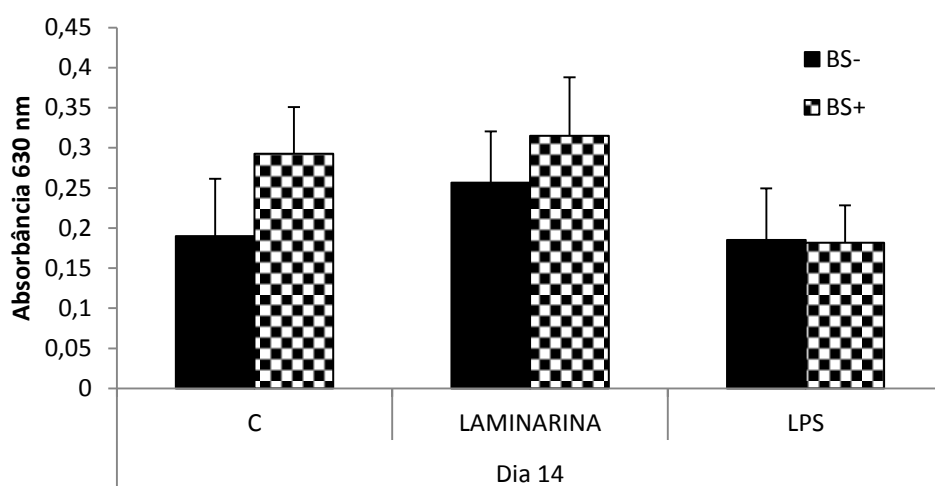


Figura 9. Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* estimulados *in vitro* por um dos indutores (laminarina ou LPS) e quantificada através do método de redução do NBT após 14 dias da alimentação dos animais com ração acrescida de 0,3% (BS+) ou 0% (BS-) de biomassa seca de *Spirulina platensis*. As barras representam a média \pm DP. C= produção basal de O_2^- .

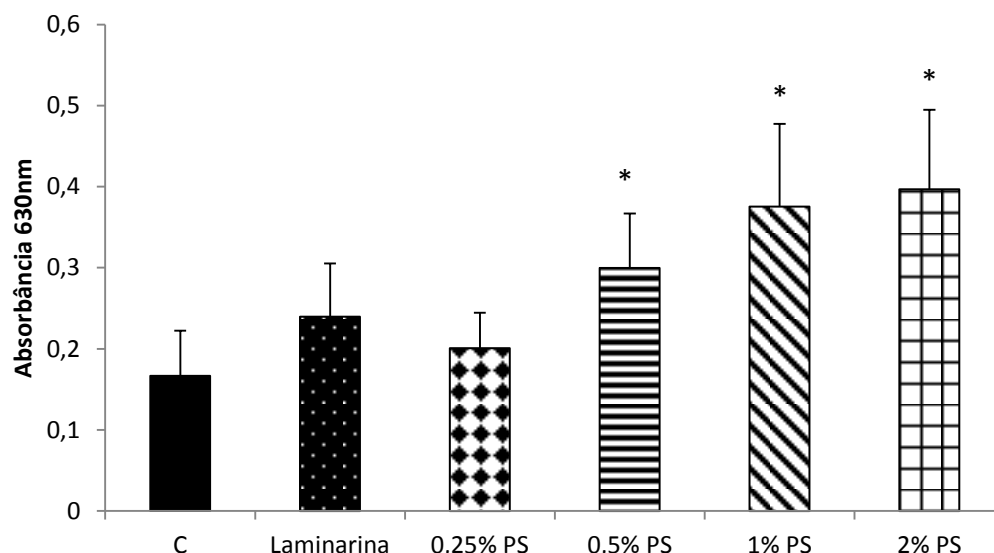


Figura 10. Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* estimulados *in vitro* por um dos indutores (Laminarina ou PS de *S. platensis*) e quantificada através da redução do NBT. As barras representam a média ± DP. Asterisco (*) representa as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a produção de O_2^- induzida por laminarina ou PS em relação à produção basal (C).

3.7. Consumo alimentar

O consumo alimentar dos animais tratados com ração suplementada com PS de espirulina foi maior do que aquele dos animais alimentados com biomassa seca (BS). Em relação ao grupo que recebeu BS, o consumo (0,8%) não foi diferente daquele dos animais controle (0,7%). Ofertou-se uma quantidade de ração equivalente a 2% do peso vivo e o consumo foi inferior, ou seja, em torno de 0,8%, independentemente da suplementação.

No caso dos animais tratados com PS, novamente foi ofertada a ração em quantidade equivalente a 2% da biomassa, sendo que os animais PS+ consumiram 1,5%, enquanto os animais controle (PS-) consumiram apenas 1% do peso vivo.

4. Discussão

A busca por substâncias capazes de aumentar a imunocompetência de camarões é de extrema importância em vista dos enormes prejuízos causados nos cultivos durante as infecções. No caso dos camarões, a administração de substâncias ditas imunostimulantes é efetuada através de injeção, imersão ou suplementação com complemento alimentar adicionado à ração. A imersão e a suplementação são considerados os mais adequados, pois, além da fácil administração, podem ser ministrados para uma quantidade maior de indivíduos simultaneamente e não causam estresse aos animais (SMITH *et al.*, 2003).

Em camarões, alguns relatos apontam uma possível ação imunostimulante de polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de algas; porém, ainda faltam estudos que comprovem os efeitos desses compostos ou que expliquem quais os mecanismos efetivos de sua ação. Estudos realizados com diferentes espécies de camarões, entre elas, *Litopenaeus vannamei* (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002; HOU E CHEN, 2005; YEH *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2007), *Penaeus monodon* (CHOTIGEAT *et al.*, 2004) e *Fenneropenaeus chinensis* (HUANG *et al.*, 2006), tratados com PS ou extratos de algas marinhas têm demonstrado uma ativação de alguns parâmetros do sistema imune, além de aumentar a resistência contra infecções por vibrios e reduzir o impacto causado pelo WSSV.

Além dos compostos provenientes de algas, as cianobactérias também representam uma fonte importante de substâncias imunostimulantes. Com isso, administração via oral da cianobactéria *Spirulina platensis* já foi registrada como sendo capaz de promover um aumento da resistência de peneídeos contra os conhecidos patógenos oportunistas *Vibrio* spp (LEE *et al.*, 2003; TAYAG *et al.*, 2010), mas não contra o patógeno obrigatório WSSV (RAHMAN *et al.*, 2006). Outros estudos ainda testaram o potencial imunostimulante desta cianobactéria utilizando outras formas de administração, como a imersão em água (LIN *et al.*, 2010) ou a injeção com o extrato de *S. platensis* (TAYAG *et al.*, 2010), em que alguns imunoparâmetros se mostraram mais elevados, indicando um aumento e uma melhora no *status* imunológico dos camarões *L. vannamei*. Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito da cianobactéria

S. platensis sobre a imunocompetência de adultos *L. vannamei*, através de suplementação alimentar durante o período de 14 dias.

A suplementação alimentar de *L. vannamei* com 0,3% de biomassa seca ou 0,5% de polissacarídeos sulfatados de *S. platensis* promoveu um aumento no número de hemócitos totais (CTH) em torno de 30%, após 14 dias de alimentação, sugerindo que os compostos da cianobactéria ministrados aos animais induziram a produção de novos hemócitos pelo tecido hematopoiético.

Os animais do experimento com PS, de forma geral, apresentaram um número mais elevado de hemócitos do que os animais suplementados com BS, considerando seus respectivos controles. Este fato pode estar relacionado ao menor consumo de ração observado nos animais suplementados com BS, cujo experimento foi realizado sob condições ambientais com temperaturas mais baixas (no inverno, ver discussão adiante), tais condições podem ter interferido no metabolismo dos animais, que se alimentaram menos o que, em última análise, pode ter refletido nos parâmetros testados, como a CTH.

Em um outro estudo com *L. vannamei*, também foi relatado um aumento de 29% no hemograma em 24 h e 48 h após a injeção (20 µg/g) com extrato de *S. platensis* e de 53% após ou 0,5 a 4 h de imersão (400 e 600 mg/l) (TAYAG *et al.*, 2010). Compostos de algas, também parecem aumentar o número de hemócitos circulantes ou, pelo menos, auxiliar na manutenção do hemograma estável durante um processo infeccioso. Fu e colaboradores (2007) relataram aumentos da CTH (~23%) semelhantes aos encontrados neste estudo após seis dias de alimentação com ração acrescida do extrato da alga vermelha *Gelidium amansii*. Em outro estudo, *L. vannamei* infectados experimentalmente com o WSSV (infecção branda) e que receberam suplementação alimentar com 0,3% de PS da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* tiveram a CTH inalterada nas 72 horas pós-infecção, enquanto os animais sem suplementação registraram uma diminuição de 40% na CTH após desafio, sugerindo um potencial papel imunoprotetor deste PS (CANTELLI, 2010).

Em relação à contagem diferencial de hemócitos (CDH), observou-se um aumento significativo nos HG, associado à suplementação da alimentação com BS ou PS de *S. platensis*, indicando que estes compostos melhoram as condições de imunocompetência dos camarões. Efetivamente, as HG são consideradas as células mais imunocompetentes e as grandes depositárias das

moléculas imunoefetoras dos crustáceos (*vide* revisão de JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Portanto, um aumento dessas células na circulação poderia preparar melhor os animais para combater eventuais ataques microbianos posteriores.

Se, por um lado, houve um aumento no número de HG na circulação com a suplementação alimentar, de forma equivalente, a população de HH diminuiu. Os hemócitos hialinos estão relacionados com a fagocitose (JOHANSSON *et al.*, 2000) e com a coagulação da hemolinfa (HOSE *et al.*, 1990). Uma vez que os animais não foram infectados neste estudo, não era de se esperar um aumento dessas células na circulação, mas sim ser priorizada a produção de HG que contêm em seus grânulos a maioria das moléculas imunoefetoras e imunoreguladoras (*vide* revisão de BARRACCO, PERAZZOLO E ROSA, *no prelo*).

Relatos na literatura sobre a ação imunoestimulante de PS nos hemogramas de camarões são muito controversos e de difícil comparação, em função das diferentes metodologias e PS utilizados. Para exemplificar, tratamentos com polissacarídeos em *L. vannamei* não demonstraram alterações na CTH e CDH após alimentação com ração acrescida de alginato de sódio, durante cinco meses (CHENG *et al.*, 2005), enquanto outros estudos mostram um aumento na CTH deste mesmo peneídeo após alimentação (seis dias) com ração acrescida da infusão da alga vermelha *Gelidium amansii* (aproximadamente 23%) (FU *et al.*, 2007).

Outro imunoparâmetro que aumentou significativamente (entre 30% e 53%) em ambos os tratamentos realizados neste estudo foi a atividade específica da fenoloxidase (PO). A PO é produzida a partir da ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO), desencadeada por LPS de bactérias Gram-negativas e β -1,3-glicanas de fungos. Tal sistema é reconhecido como uma das principais respostas imunoefetoras nestes animais, (*vide* revisão CERENIUS *et al.*, 2008). Apesar de ambas preparações da cianobactéria *S. platensis* terem sido capazes de aumentar a atividade da PO, os polissacarídeos sulfatados induziram cerca de duas vezes mais que a biomassa seca. A diferença entre os valores nos diferentes tratamentos (BS ou PS) pode ser devida a dois fatores: (1) a diferença de material biológico utilizado para as análises de PO: soro no experimento com suplementação com BS e hemolinfa total, no caso dos PS ou

(2) os PS são melhores indutores já que estavam em concentração mais alta na ração (0,5%) do que na biomassa seca, que possui ambos PS e LPS.

Cabe lembrar, contudo, que os resultados apresentados de atividade enzimática específica da PO, sejam de hemolinfa total ou de soro, são relativos aos respectivos controles e que, teoricamente, não justificariam o aumento de 2x, registrado na suplementação com PS. Sendo assim, este fato sustentaria a hipótese de que a imunoestimulação é mais efetiva quando se utilizam os PS extraídos da cianobactéria, em vez da biomassa seca nas concentrações utilizadas. Ressalta-se ainda que ambos os experimentos deveriam ter sido feitos com o mesmo material (soro ou hemolinfa total), mas, em virtude da oferta de animais, do espaço físico para acomodá-los e das análises previstas, isso não pôde ser realizado.

A utilização de hemolinfa total (plasma + hemócitos) para a avaliação de imunoparâmetros apresenta algumas vantagens em relação à utilização do soro, especialmente quando: (a) um grande número de animais deve ser amostrado, pois as análises são feitas simultaneamente, logo após a coleta; (b) é requerido reutilizar o animal ou quando o número ou tamanho dos animais é reduzido, já que apenas pequenos volumes de hemolinfa são coletados de cada indivíduo; e (c) quando se requer rapidez na obtenção dos resultados.

Aumentos na atividade da PO também foram relatados em *L. vannamei* por Tayag e colaboradores (2010), após imersão dos animais em água contendo o extrato de *S. platensis*. Segundo os autores, o aumento da concentração do extrato (400 e 600 mg/l) na água de imersão promoveu aumentos proporcionais da PO em até 4h após a imersão, enquanto a injeção do extrato (20 µg/g), induziu o aumento dos níveis da PO até 96 h. Contudo, cabe ressaltar que mais comparações não são possíveis de serem feitas, uma vez que os resultados de PO fornecidos por Tayag e colaboradores (2010) foram expressos como a formação de dopacromo no volume de hemolinfa utilizado na análise (50 µl), e não estão, portanto, de acordo com o recomendado para expressar a atividade enzimática específica (SÖDERHÄLL E HÄLL, 1984). Dessa forma, os resultados apresentados por este grupo podem ter interpretações diferentes das apresentadas aqui.

De maneira interessante, o aumento da atividade da PO registrado no presente estudo foi compatível ao aumento dos HG, células que armazenam

ambas as formas zimogênicas proPO e a serino protease ativadora da proPO (pró-ppA), e que iniciam a ativação proteolítica do sistema (*vide* revisão JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Cantelli (2010) encontrou também um aumento na atividade da PO de *L. vannamei* infectados com WSSV e alimentados com PS de *G. birdiae*. Apesar deste aumento ter sido tardio, observado somente após 14 dias de suplementação, foi também coincidente com o retorno dos HG na circulação.

A capacidade aglutinante do soro de *L. vannamei*, avaliada neste estudo apenas nos animais alimentados com ração acrescida de BS, teve um aumento significativo de 20% no título hemaglutinante a partir de sete dias de suplementação alimentar, sugerindo que estes compostos estimulem a produção de aglutininas na hemolinfa dos camarões. Estes resultados são interessantes, pois em outro estudo a suplementação com 0,3% PS da macroalga *G. birdiae* não foi capaz de aumentar os títulos aglutinantes de *L. vannamei* brandamente infectados com WSSV até 14 dias (CANTELLI, 2010). Aumentos significativos foram, no entanto, observados após 14 dias de suplementação. Cabe ressaltar que relatos na literatura sobre o efeito de PS sobre a capacidade hemaglutinante da hemolinfa de camarões são escassos, o que dificulta comparações mais aprofundadas. Além disso, deve-se levar em conta que, para se chegar a conclusões mais definitivas, deve ser considerada, entre outros fatores, a natureza dos PS utilizados, sua concentração no experimento, a forma e a frequência de administração aos animais.

As lectinas, além de sua função de reconhecimento do não-próprio e aglutinação celular em peneídeos, parecem ter ainda um importante papel imunoefetor na eliminação de patógenos. Estudos recentes relataram que algumas lectinas de peneídeos apresentam ação antimicrobiana contra certas bactérias e fungos (SUN *et al.*, 2008), se ligam e interagem com a proteína do envelope viral VP28 do WSSV (WANG *et al.*, 2009). Devem, portanto, estar também implicadas na defesa antiviral (SONG *et al.*, 2010). Diante dos resultados obtidos no presente estudo e considerando o acima exposto, estudos futuros de suplementação com BS e PS de *S. platensis* associado ao desafio bacteriano e/ou viral dos camarões serão necessários para se avaliar com maior precisão o efeito imunoestimulante e/ou imunoprotetor destes compostos.

Em relação à concentração de proteínas totais da hemolinfa, apenas a suplementação com PS foi capaz de aumentar em 25% os valores de CP após 14 dias de tratamento, o que sugere mais uma vez que os PS da cianobactéria são compostos que melhoram as condições de imunocompetência dos camarões, com o aumento das proteínas da hemolinfa, incluindo aquelas que possuem funções imunológicas.

Por outro lado, a diminuição de 10% na CP dos animais alimentados com BS, pode estar novamente relacionada ao baixo consumo alimentar (0,8% do peso vivo) que, como mencionado anteriormente, pode ter ocorrido pelo fato do experimento ter sido realizado em período de inverno.

Outro aspecto importante da análise deste imunoparâmetro foi que os valores absolutos de CP do soro foram maiores que os da hemolinfa total. Estes valores não se referem à suplementação com BS, mas sim com o material biológico utilizado para a análise. Como já dito anteriormente, material biológico diferente pode gerar diferenças nos resultados dos ensaios, contudo, é preciso analisar os valores em relação ao respectivo controle e, neste sentido, pode-se afirmar que a suplementação com os PS aumentou a CP da hemolinfa dos camarões.

Na literatura, são encontrados dois estudos relatando a CP em animais da mesma espécie *L. vannamei*, com valores absolutos diferentes para hemolinfa total (CANTELLI, 2010) e soro (COSTA *et al.*, 2009). A média da CP da hemolinfa total foi de 70 mg/ml. Enquanto valores maiores (média de 120 mg/ml) foram encontrados para CP do soro.

A suplementação alimentar por 14 dias com BS de *S. platensis* não aumentou a capacidade dos hemócitos de *L. vannamei* de produzir radicais livres, indicando que a BS de cianobactéria, na concentração utilizada (0,3%), não induziu o *burst* respiratório nos camarões. Talvez concentrações maiores de BS devam ser ministradas aos animais e outros estudos sejam necessários para comprovar esta hipótese. Por outro lado, a ausência de um aumento, neste caso, poderia estar relacionada ao fato de os animais não terem sido desafiados com nenhum patógeno, tornando a produção excessiva de O_2^- dispensável para manutenção de suas funções.

Diferentemente do encontrado neste estudo, Lin e colaboradores (2010) relataram aumentos significativos na produção *in vitro* de O_2^- pelos hemócitos,

após imersão de *L. vannamei* com extrato de *S. platensis* (600 mg/l). Além disso, relatos de aumento na atividade fagocítica e na eficiência de *clearance* de *Vibrio alginolyticus* são descritos para camarões *L. vannamei* injetados (20 µg/g) ou imersos (400-600 mg/l) por 12 - 72 horas e 3 - 4 horas, respectivamente, com extrato de *S. platensis* (TAYAG *et al*, 2010). Cantelli (2010) relata que houve um aumento tardio (14º dia) na produção de radicais livres após indução com LPS; porém, não com laminarina. Este aumento, no entanto, não estava relacionado à alimentação suplementada com PS, uma vez que esteve presente em todos os grupos independente do tratamento.

Apesar de neste estudo ficar demonstrado que a suplementação alimentar com 0,3% de BS de *S. platensis*, não induziu *burst* respiratório nos camarões, os PS desta cianobactéria mostraram-se como bons indutores *in vitro* dos hemócitos de *L. vannamei* (0,5 – 2 mg/ml). Este representa o primeiro relato de utilização de um polissacarídeo sulfatado como indutor *in vitro* de hemócitos de camarão, para quantificar a produção de O_2^- pela técnica do NBT. Este PS poderá então ser utilizado em estudos futuros de quantificação de EROs, tais como outros polissacarídeos microbianos rotineiramente empregados como indutores celulares: LPS de bactérias Gram-negativas e β -glicanas da parede de fungos e algas (zimozan; laminarina) (GUERTLER *et al.*, 2010).

Como foi mencionado anteriormente, o consumo alimentar dos animais cuja ração foi suplementada com BS foi mais baixo do que nos animais cuja ração recebeu os PS. Uma hipótese sugerida para explicar esse consumo reduzido foi a baixa temperatura ambiente ao longo do experimento com BS (julho/11), em ambiente não-climatizado. No experimento com PS, realizado no outono (maio/12), houve um aumento de 2x no consumo alimentar, sugerindo que, além do que já foi citado, a ração acrescida de PS pode ser mais palatável para os animais, uma vez que o grupo BS- apresentou um consumo 50% menor do que o grupo PS-. Em outros estudos envolvendo ração acrescida de *S. platensis* com pós-larvas de *L. vannamei*, houve um aumento de 2x no peso dos animais ao longo do experimento (NETO, 2008).

Em conclusão, os resultados encontrados neste estudo mostraram que a suplementação alimentar de camarões *L. vannamei* tanto com extrato seco, como com polissacarídeos sulfatos da cianobactéria *S. platensis* aumentou as

condições de imunocompetência dos animais, avaliada através de diferentes parâmetros hemato-imunológicos. Após a alimentação dos camarões durante 14 dias, com ração suplementada com biomassa seca, pôde-se observar aumentos significativos de 43%, 20% e 33%, respectivamente, na atividade da fenoloxidase, capacidade hemaglutinante e contagem de hemócitos totais na hemolinfa. A adição de PS a ração, por sua vez, provocou um aumento ainda maior na atividade da PO (53%) e na concentração de proteínas totais (25%). Estudos complementares estão em andamento em no mesmo laboratório em que este trabalho foi realizado, como a avaliação da modulação de sete genes imunológicos (proPO, β GBP, LBGBP, TGase, Crustina, Lisosima, MgSOD, ALF) em camarões suplementados com PS (0,5%) de espirulina. Estes estudos serão fundamentais para elucidar se estes PS possuem um efeito imunomodulador sobre *L. vannamei*. Além disso, infecções experimentais de camarões tratados com PS com patógenos de peneídeos (bactérias ou vírus) devem ser realizadas para avaliar o efeito dos PS de *S. platensis* durante os processos infecciosos. Em caso positivo, estes compostos poderiam ser incorporados à ração de animais cultivados para aumentar a resistência dos animais às infecções microbianas.

5. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, R.S. 1996. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: SÖDERHÄLL, K., IWANAGA, S.; VASTA, G.R. (eds.). New Directions in Invertebrate Immunology. Fair Haven, SOS Publication. p. 109-129.
- AQUINO, R.S. et al. 2005. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. Glycobiology, v. 15, n.1, p. 11-20.
- ARMSTRONG, P.B., 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in hostpathogen interaction. Immunobiology 211, 263-281.
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture v.191, p. 3-11, 2000.
- BARBIERI, R.C.J; OSTRENSKY, A.N. Camarões marinhos: Engorda. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002, 352p.
- BARRACCO, M.A; PERAZZOLO, L.M; ROSA, R.D. Inmunologia del camarón. In: VIELKA, M.Q; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos, CYTED, 2008, pp. 169-224.
- BELAY, A; OTA, Y; MIYAKAWA, K; SHIMAMATSU, H. 1993; Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. J Appl Phycol 5:235-41.

BELAY A. 2002; The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. J Am Nutraceut Assoc;5:26e46.

BERGER, C. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. in: avances en nutrición acuícola. memorial del v simposium internacional de nutrición acuícola, 5., 2000, yucatan. anais eletrônicos yucatan:merida, 2000. p.102-110. disponível em: <www.educacion.uanl.mx/ publicaciones/ maricultura/ acuiculturav/berger.pdf>. Acesso em: 27 de maio de 2012.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Current Opinion Immunol. 12, 64-76

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol, 12: 64-76.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A. BORGHETTI, J.R. AQUICULTURA: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 12p.

BOYD, C.E. Water quality in Warmwater fish ponds. Opelika: Craftmaster Printers Inc., 1979, 359p.

BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 249-254.

BUGLIONE NETO, C. C. Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca em ração comercial suplementada com probiótico para *Litopenaeus vannamei*. 2009. 41f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; ASCENCIO, F. 2002a. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 133: 557-565.

CANTELLI L. Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracillaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina 2009; 68p.

CÁSSARO, C.M.F; DIETRICH, C.P. 1977 Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. Journal of Biological Chemistry, v. 252, n. 7, p. 2254-2261.

CERENIUS, L., SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immun Rev 2004; 198: 116-126.

CERENIUS, L.; KAWABATA, S.; LEE, B.L.; NONAKA, M.; SÖDERHÄLL, K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends Biochem Sci, 35: 575-583.

CERENIUS, L.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol, 29: 263-271.

CHANG, C-C. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunology v. 20, p. 574-585, 2006.

CHENG W. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and b-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, v. 18, p. 297-310, 2005.

- CHENG, W.; TSAI, I.H.; HUANG, C.J.; CHIANG, P.C.; CHENG, C.H.; YEH, M.S. 2008. Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Dev Comp Immunol, 32: 265-274.
- COSTA, A.M.; BUGLIONE, C.C.; BEZERRA, F.L.; MARTINS, P.C.C.; BARRACCO, M.A. 2009. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. Aquaculture, 291: 141-146.
- DUNCAN P, KLESIUS P. Effects of Spirulina on specific and non-specific immune responses.
- EPAGRI/CEPA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, 2008-2009.
- FAO. 2010. Fisheries and Aquaculture Statistics- Aquaculture Production.
- FAO. 2007. Fisheries and Aquaculture Department.
- FU, Y.W.; HOU, W.Y.; YEH, S.T.; LI, C.H.; CHEN, J.C. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol, 22: 673-685.
- GARGIONI, R; BARRACCO, M.A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. Journal of Morphology, v. 236, p. 209-221, 1998.
- GUERTLER, C.; SCHLEDER, D.D.; BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M. 2010. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. Aquac Res, 41: 1082-1088.
- HAYASHI et al. 1996. *Calcium Spirulan*, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga Spirulina. Journal of Natural Products, 59, 83-87. Japan.
- HIRAHASHI T, M. MATSUMOTO, K. HAZEKI, Y. SAEKI, M. Ui, T. SEYA. 2002. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis. Int Immunopharmacol. 2(4):423-34.
- HOLMBLAD, T. SODERHALL, K, 1999; Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture, v. 172, p. 111-123.
- HOSE, J.E; MARTIN, G.G; GERARD, A.S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biological Bulletin, v. 178, p. 33-45, 1990.
- HUANG, T.S.; WANG, H.; LEE, S.Y.; JOHANSSON, M.W.; SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. 2000. A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila* masquerade. J Biol Chem, 275: 9996-10001.
- IDEMA-Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Desenvolvimento Sustentável – RN Melhor para Carcinicultura. Ano I (1), 1-6, fev. 2006.
- JASSBY, A. 1988; Spirulina: a model for microalgae as human food. Algae and Human Affairs. Cambridge University Press, p. 152.
- JIRAVANICHPAISAL, P; LEE, B.L; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, v. 211, p. 213-236, 2006.
- JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191: 45-52.

JOHNSON, K.N.; van HULTEN, M.C.; BARNES, A.C. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine*, v. 8, p. 4885-4892, 2008.

KAY, R.A. 1991; Microalgae as food and supplement. *Clin. Rev. Food. Sci. Nutr.* 30(6): 555-573.

KURTZ, J.; ARMITAGE, S.A. Alternative adaptative immunity in invertebrates. *Trends Immunology*, v. 27, p. 493-496, 2006.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, v. 425, p. 37-38, 2003.

LEE YK, CHEW PF, SOH BS, THAM LY. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus mergueneis* by feeding *Spirulina platensis*. *J Appl Phycol* 2003;15:279e87.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Immunol*, 166: 7319-7326.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.

LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV. History in the Americas and Current Status. In: Y. Sakai, J.P. McVey, D. Jang, E. McVey and M. Caesar (ed), *Proceedings of the US-Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR) Aquaculture Panel Meeting*, 2003. p. 6-24.

LIN, Y.C. et al. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*, v. 44, p. 1065-1074, 2007a.

LIN, Y.C. et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin (α 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 44, p. 1065-1074, 2007b.

LOKER, E.S.; ADEMA, C.M.; ZHANG, S.M.; KEPLER, T.B. 2004. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev*, 198: 10-24.

MARQUES, M.R.F; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191, n. 1-3, p. 23-44, 2000.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G.F; WITMANN, H.G. (Eds.), *Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution*, Berlin: Springer-Verlag, p. 93-125, 1975.

MIRANDA MS, CINTRA RG, BARROS SBM, MANCINI-FILHO J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:1075e9.

NETO, JFS, TORRES VM, LIMA PWC e FARIAS WLF, Cultivo experimental de pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetidas a três estratégias de alimentação. 2008, *Revista Ciência Agronômica*, v. 39, n. 3, p. 410-415.

NUNES, A. J. P. O cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 11, p. 37-51, 2001.

NUNES, A.J.; MARTINS, P.C.; GESTEIRA, T.C. 2004. Carcinicultura ameaçada. Produtores sofrem com mortalidade decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). *Panoram Aqui*, 83: 37-51.

- OSTRENSKY, A. Estudos para viabilização dos cultivos comerciais de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil. 1997. 235p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: The Polysaccharides, New York: Academic Press, 195p, 1983.
- PERAZZOLO, L.M; ROSA, R.D.; BARRACCO, M.A. Defesas antivirais em crustáceos: Estado da Arte. In: SILVA-SOUZA, A.T; LIZAMA, M.A.P; TAKEMOTO, R.M. Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá-PR: ABRAPOA 2010 (no prelo).
- PÉREZ-FARFANTE, J.; KENSLE, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns on the world. In: Key of diagnoses for the families and genera. Éditions du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 1997 p 233.
- RAHMAN MM, ESCOBEDO-BONILLA CM, WILLE M, ALDAY SANZ V, Audoorn L, Neyts J, et al. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free. 2006.
- RODRIGUES, J.A.G. Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- SEIFFERT, W.Q.; WINCLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 87, p. 51-53 jan/fev, 2005.
- SMITH, V.J.; BROWN, J.H.; HAUTON, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? Fish Shellfish Immunol, 15: 71-90.
- SODERHALL K., CERENIUS, L., 1998 Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.
- SÖDERHÄLL, K., SMITH, V.J. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and the other marine decapods and prophenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology, v. 7, p. 229-239, 1983.
- SODERHÄLL, K.; HALL, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activation system in crayfish haemocyte lysate. Biochem.Biophys. Acta 797,99-104.
- SUN, Y.D.; FU, L.D.; JIA, Y.P.; DU, X.J.; WANG, Q.; WANG, Y.H.; ZHAO, X.F.; YU, X.Q.; WANG, J.X. 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. Mol Immunol, 45: 348-361.
- TAVARES, E.C.B; SANTOS, M.A.S. Estudo exploratório da cadeia produtiva da carcinicultura no estado do Pará: o caso do *Litopenaeus vannamei*. Amazônia Ciência e Desenvolvimento, v. 1 (2), p. 85-96, 2006.
- TAYAG CM, YONG-CHIN L, CHANG-CHE L, CHYNG H L, JIANN-CHU C. 2010; Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 28 764 e 773.
- VAVRICKA, C.J.; CHRISTENSEN, B.M.; LI, J. 2010. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. Protein Cell, 1: 830-841.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. 233 p
- WANG, L. et al. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. Developmental and Comparative Immunology, v.32, p. 706-71, 2008.

WASIELESKY, W. J. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. 2000, 199 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

WATANUKI H, OTA H, TASSAKA ACMAR, KATO T, SAKAI M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 2006;258:157e63.

WEISE G, DREWS G, JANN B, Jann K. Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Arch Mikrobiol.* 1970;71(1):89–98N2006;258:157e63.

YEH, S.T.; LEE, C.S.; CHEN, J.C. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 332-345.

YEH, S-P. et al. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 26, p. 582–588, 2009.